

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium kultur Mitra Anggrek Indonesia, jalan Hasanuddin I, No 24, Junrejo, Batu, Malang. Waktu pelaksanaan pada bulan Juli - Oktober 2018.

#### 3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow carbinet* (LAFC), autoklaf, botol kultur, cawan petri, *scalpel blade*, pipet ukur erlenmeyer, bunsen burner, gelas kimia, timbangan analitik, pH meter, kertas saring.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media kultur *Murashige Skoog* (MS), mata tunas tanaman nanas *Smooth cayenne*, media MS, ZPT Auksin 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid*), ZPT Sitokinin BAP (*Benzyl Amino Purine*), TDZ (*Thidiazuron*), klorox, alkohol, aquadest steril, sukrosa, dan agar.

#### 3.3. Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok dua faktorial. Faktor pertama yakni menggunakan konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Auksin 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid*) dengan 4 taraf, yaitu :

D<sub>0</sub>: (Tanpa 2,4-D)

D<sub>1</sub>: 2,4-D (3,0 ppm)

D<sub>2</sub>: 2,4-D (4,0 ppm)

D<sub>3</sub>: 2,4-D (5,0 ppm).

Faktor 2 yakni menggunakan konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Sitokinin *Benzyl Amino Purin* (BAP) dan *Thidiazuron* (TDZ) dengan 6 taraf dimana pada masing-masing berjumlah 3 taraf, yaitu:

S<sub>0</sub>: (Tanpa BAP)

S<sub>1</sub>: *Thidiazuron* 0,001 ppm

S<sub>2</sub>: *Thidiazuron* 0,01 ppm

S<sub>3</sub>: *Thidiazuron* 0,1 ppm

S<sub>4</sub>: BAP 2,0 ppm

S<sub>5</sub>: BAP 4,0 ppm

Sehingga, kombinasi dari kedua faktor tersebut di dapatkan total 24 perlakuan kombinasi dan masing-masing diulang sebanyak 3 kali ulangan. Pada setiap ulangan masing-masing menggunakan 4 sample. Jumlah botol kultur yang digunakan dalam penelitian yakni 288 botol. Rincian perlakuan sebagai berikut :

**Tabel 1. Kombinasi 24 Perlakuan (2,4-D dan Sitokinin)**

	<b>D0</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>
<b>S0</b>	D0S0	D1S0	D2S0	D3S0
<b>S1</b>	D0S1	D1S1	D2S1	D3S1
<b>S2</b>	D0S2	D1S2	D2S2	D3S2
<b>S3</b>	D0S3	D1S3	D2S3	D3S3
<b>S4</b>	D0S4	D1S4	D2S4	D3S4
<b>S5</b>	D0S5	D1S5	D2S5	D3S5

Keterangan :

D0S0 : 0 mg/L 2,4-D + 0 mg/L BAP

D0S1 : 0 mg/L 2,4-D + 0,001 mg/L *Thidiazuron*

D0S2 : 0 mg/L 2,4-D + 0,01 mg/L *Thidiazuron*

D0S3 : 0 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L *Thidiazuron*

D0S4 : 0 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BAP

D0S5 : 0 mg/L 2,4-D + 6 mg/L BAP

D1S0 : 3 mg/L 2,4-D + 0 mg/L BAP

D1S1 : 3 mg/L 2,4-D + 0,001 mg/L *Thidiazuron*

D1S2 : 3 mg/L 2,4-D + 0,01 mg/L *Thidiazuron*

D1S3 :3 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L *Thidiazuron*

D1S4 :3 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BAP

D1S5 :3 mg/L 2,4-D + 4 mg/L BAP

D2S0 :4 mg/L 2,4-D + 0 mg/L BAP

D2S1 :4 mg/L 2,4-D + 0,001 mg/L *Thidiazuron*

D2S2 :4 mg/L 2,4-D + 0,01 mg/L *Thidiazuron*

D2S3 :4 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L *Thidiazuron*

D2S4 :4 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BAP

D2S5 :4 mg/L 2,4-D + 4 mg/L BAP

D3S0 :5 mg/L 2,4-D + 0 mg/L BAP

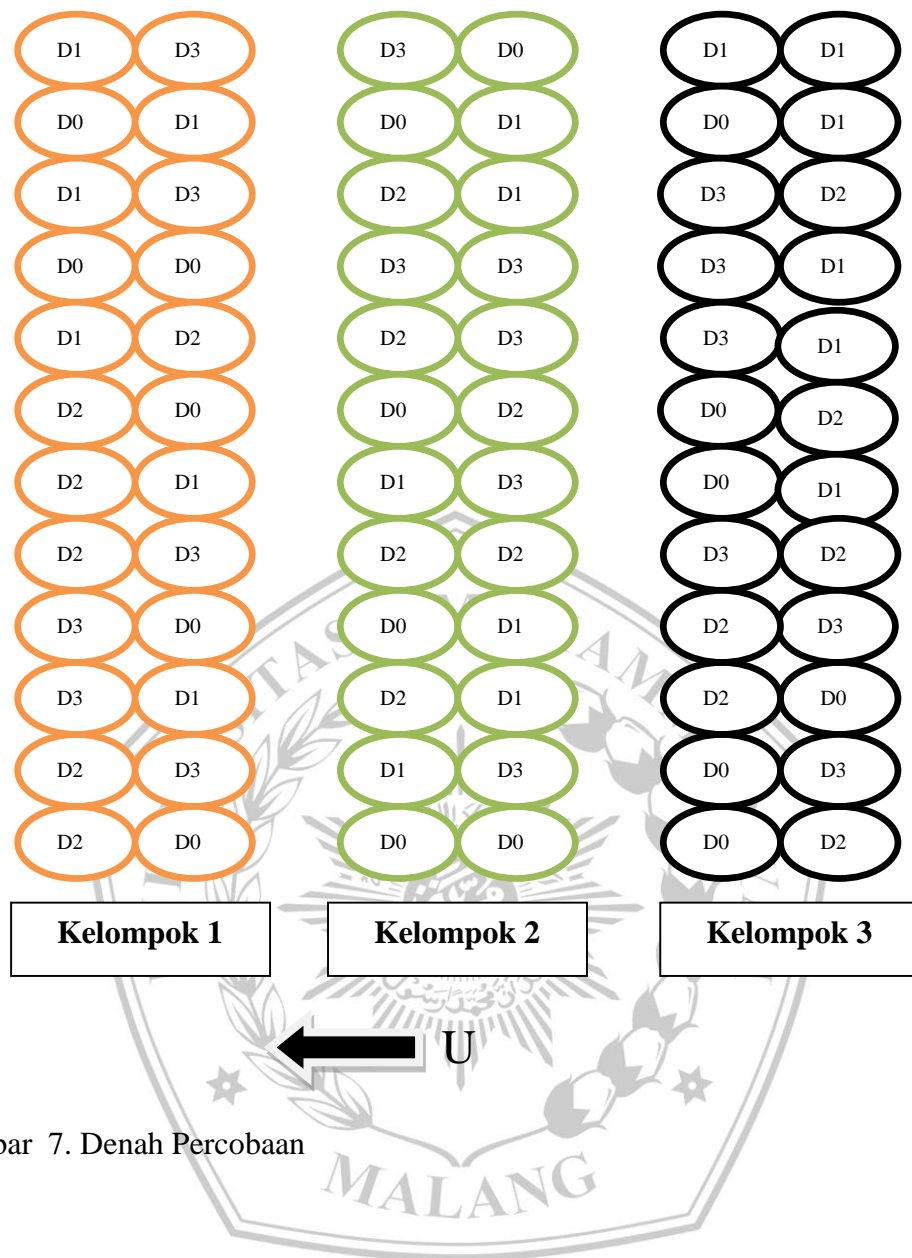
D3S1 :5 mg/L 2,4-D + 0,001 mg/L *Thidiazuron*

D3S2 :5 mg/L 2,4-D + 0,01 mg/L *Thidiazuron*

D3S3 :5 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L *Thidiazuron*

D3S4 :5 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BAP

D3S5 :5 mg/L 2,4-D + 4 mg/L BAP



Gambar 7. Denah Percobaan

### **3.4. Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.1. Persiapan dan Sterilisaasi Alat**

Menyiapkan botol kultur dan alat-alat yang akan digunakan yakni *petridish*, scapel, pinset, dan botol kultur. Kemudian mencuci bersih botol kultur yang akan digunakan dan alat-alat dengan menggunakan sabun cuci, lalu dikeringkan. Setelah dalam kondisi kering alat yang berupa *petridish*, scapel, pinset dibungkus dengan menggunakan kertas dan plastik. Sterilisasi yang akan digunakan adalah jenis sterilisasi menggunakan uap dan tekanan. Menyiapkan autoclave, tabung gas dan kompor, lalu mengisi air bersih kedalam autoclave sampai batas tertentu. Memasang sekat yang ada di autoclave, untuk meletakkan alat-alat kultur yang akan disterilisasi. Kemudian, meletakkan alat-alat yang akan disterilisasi. Menutup rapat autoclave. Kemudian, memanaskan autoclave sampai tekanan 10 psi. Menjaga kestabilan tekanan 10 psi selama 20 menit, setelah itu 20 menit berlangsung kompor dimatikan. Menunggu sampai autoclave dingin sebelum membuka tutup, jika tutup autoclave langsung dibuka maka akan menyebabkan botol kultur dan alat-alat yang berbahan kaca akan pecah dikarenakan tekanannya masih dalam kondisi tinggi. Kemudian, mengeluarkan alat-alat dan diletakkan pada ruangan yang steril, selanjutnya alat telah siap untuk digunakan.

#### **3.4.2. Pembuatan larutan stok**

Menyiapkan alat dan bahan (unsur makro dan mikro komposisi media MS) yang digunakan. Menghitung dan menimbang masing-masing bahan komposisi media MS. Untuk kepekatan hara makro 100 kali, sedangkan hara mikro 1000 kali. Mengencerkan bahan yang sudah di timbang dengan aquades. Mengaduk

larutan sampai homogen. Memasukkan dalam botol dan diberikan label pada tiap botolnya lalu simpan dalam refrigerator (agar larutan tetap awet).

#### **3.4.3. Pembuatan Media Murashige & Skoog (MS)**

Membuat media larutan MS sejumlah 2 liter. Pembuatan larutan MS bertujuan untuk pengadaptasian terhadap tingkat kontaminasi Eksplan nanas *Smooth cayenne* atau dapat dikatakan juga media larutan pra-perlakuan.

Membuat larutan MS untuk masuk dalam tindakan perlakuan setelah eksplan nanas berada pada larutan MS (media larutan pra-perlakuan) selama 2 minggu lamanya. Menyiapkan bahan dan alat yang digunakan. Menimbang masing-masing bahan komposisi media MS dan zat pengatur tumbuh yang digunakan. Memasukkan semua bahan ke dalam gelas ukur kecuali agar. Menambahkan air sampai 1 liter. Larutan dikondisikan pada pH 5,8 dengan menambahkan NaOH untuk menaikkan pH dan HCl untuk menurunkan pH. Memasak larutan dan menambahkan agar sedikit demi sedikit agar tidak menggumpal. Mengaduk sampai homogen dan mendidih. Memasukkan larutan ke dalam botol kultur. Menutup botol dengan plastik dan diikat dengan karet. Media dimasukkan ke dalam autoclave untuk disterilisasi dengan tekanan 10 psi selama 15 menit. Botol-botol kultur berisi media selanjutnya disimpan pada rak-rak kultur. Media disimpan selama 1 minggu untuk mengetahui apakah media mengalami kontaminasi sebelum digunakan.

#### **3.4.4. Inokulasi plantlet Nanas**

Penanaman plantlet Nanas dilakukan didalam LAF (*Laminar Air Flow*) dalam kondisi yang aseptik. Alat-alat yang akan digunakan seperti cawan petri,

scalpel, blade, kertas saring steril, pinset lacip, tisu, alkohol, dan label ditata didalam LAF. Setiap akan menggunakan alat saat bekerja didalam LAF alat-alat tersebut dicelupkan ke dalam alkohol dengan tingkat koensentrasi 96% dan dipanaskan diatas api bunsen kurang lebih 10 detik. Pemotongan plantlet nanas varietas *Smooth cayenne* menghilangkan bagian tepi bagian tunas dan dipotong hingga membentuk persegi empat menggunakan *scalpel blade*. Menanam bagian eksplan ke dalam botol media yang sudah di panaskan bibir botolnya, kemudian menutup kembali botol tersebut dan menyimpan kembali dalam rak penyimpanan atau rak kultur.

Penanaman eksplan dilakukan dengan masing-masing potongan plantlet yang ditanam dengan meletakkannya pada botol kultur yang sudah dipanaskan bibir botolnya dengan komposisi media kultur sesuai dengan perlakuan.

### **3.5. Variable Pengamatan**

Perubahan yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

#### **3.5.1 Persentase Hidup Eksplan**

Diamati eksplan setiap minggu setelah tanam eksplan.

#### **3.5.2 Persentase Adanya Kalus**

Diamati kapan kalus muncul dan pencacatan dilakukan setiap minggu saat kalus muncul.

### 3.5.3. Tekstur Kalus

Pengamatan tekstur secara visual menggunakan pedoman standart warna kalus. Pengamatan dilaksanakan pada saat 7 hari setelah kalus muncul sampai akhir penelitian yakni pada 60 his.

Pengamatan tekstur kalus diamati pada akhir pengamatan yang dikelompokkan menjadi kompak dan remah (Turhan, 2011).

Rumus perhitungan:

$$\% \text{ Tekstur Kalus} = \frac{\sum \text{Tekstur kalus} \times 100\%}{\sum \text{seluruh eksplan}}$$

### 3.5.4. Persentase Kontaminasi

Perhitungan persentase kontaminasi yang terjadi pada planlet dengan planlet tidak terkontaminasi. Penghitungan keseluruhan dilaksanakan saat setelah hari inokulasi dilakukan sampai dengan 49 hst.

### 3.5.5. Pengamatan Histologi

Pengamatan jaringan secara histologi menurut Kasi, *et.al* (2008) dapat dilakukan dengan cara :

1. Preparat histologi dibuat dari kalus noduler yang diperoleh dari masing-masing.
2. Material (kalus noduler) difikasi dengan FAA (Formalin Actic Acid Alkohol) dengan komposisi 70% etil alkohol (80 mL), asam asetat glacial (10 mL), dan 10 mL formalin (37,5% formadehid). Material yang akan dibuat preparat dimasukkan ke dalam botol flakon yang berisi larutan FAA selama 18 jam.



3. Kemudian, dilakukan proses dehidrasi menggunakan seri larutan butanol (40%,55%,70%,85%, dan 100%) masing-masing dilakukan selama 18 jam.
4. Selanjutnya cairan dehidran diganti dengan larutan butsnol:paraplast (1:1) sebelum memasuki proses embedding.
5. Spesimen diembedding dengan menggunakan lilin Paraplast (sigma).
6. Cetakkan hasil embedding yang berisi material disimpan pada suhu ruangan.
7. Pengirisan dilakukan dengan alat mikrotom putar dengan ketebalan irisan 10 $\mu$ m dan pewarnaan menggunakan safranin 1% dalam akuades.
8. Preparat histologi diamati dibawah mikroskop binokuler.

#### **3.5.6. Analisis dan Penyajian Data**

Data hasil pengamatan yang telah dianalisis menggunakan analisa varian (ANAVA), untuk dapat mengetahui ada tidaknya interaksi antar faktor dan pengaruh masing-masing faktor. Serta uji BNJ taraf 5% untuk melihat perbedaan antar perlakuan. Penyajian data dengan menggunakan tabel atau kurva.